

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Marieta Bagarić

7102/BT

KLONIRANJE FRAGMENTA DNA UMNOŽENOG PCR METODOM U PLAZMIDNI
VEKTOR
ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija

Mentor: izv.prof.dr.sc. Renata Teparić

Zagreb, 2017.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za biokemiju

KLONIRANJE FRAGMENTA DNA UMNOŽENOG PCR METODOM U PLAZMIDNI VEKTOR

Marieta Bagarić, 7102/BT

Sažetak : Kloniranje gena ili dijelova gena u molekularnoj biologiji je skup metoda kojima se željene sekvence iz DNA molekule umnažaju u stanici domaćinu. Eksperimentalni rad započinje umnažanjem željenog fragmenta DNA konvencionalnim metodama poput PCR-a i cijepanjem DNA restrikcijskim enzimima. Nakon toga slijedi ligacija fragmenta DNA (inserta) i lineariziranog plazmidnog vektora kako bi se osiguralo nastajanje plazmida koji se može replicirati u stanici domaćinu te unošenje plazmida u stanicu domaćina u kojoj dolazi do njegovog umnažanja. Na taj način iz jedne rekombinantne DNA nastaje veliki broj istovjetnih molekula DNA što predstavlja samu bit kloniranja. U ovom radu konstruiran je insert $\Delta 246$ iz gena *SCW4* kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te je ugrađen takozvanom TA-ligacijom u plazmidni vektor pGem-T Easy. Takvim plazmidom su transformirane kompetentne stanice bakterije *Escherichia coli*. Naposljetku je iz transformiranih stanica izoliran umnoženi plazmid, koji je podvrgnut restrikcijskoj analizi odgovarajućim restrikcijskim enzimima te je rezultat provjeren elektroforetskom analizom restrikcijske smjese.

Ključne riječi: Kloniranje, ligacija, transformacija

Rad sadrži: 34 stranice, 16 slika, 5 tablica, 15 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (Pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv.prof. dr. sc. Renata Teparić

Pomoć pri izradi: mag.ing. Mateja Lozančić

Datum obrane: srpanj, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Food Technology
Department for Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

CLONING OF DNA FRAGMENT AMPLIFIED BY PCR METHOD INTO PLASMID VECTOR

Marieta Bagarić, 7102/BT

Abstract : Cloning of genes or gene fragments in molecular biology implies set of methods used to construct desired sequences of DNA and replicate them in host cells. Experimental work primarily sets on creating fragments of DNA by conventional methods including PCR and enzymatic digestion of obtained DNA fragments. Thereafter follows ligation of DNA fragment and linearised vector to ensure formation of plasmid which can replicate itself in the host cell. In this way, out of one recombinant DNA a great number of copies are produced, what is the main goal of cloning. This work is based on the construction of DNA fragment of yeast's *Saccharomyces cerevisiae* gene *SCW4* and it's ligation into the plasmid vector pGem-T Easy by TA-ligation. This newly created plasmid was introduced into competent cells of *Escherichia coli*. Cloned plasmid was isolated from transformed cells and the outcome was verified through restriction analysis.

Keywords: Cloning, ligation, transformation

Thesis contains: 34 pages, 16 figures, 5 tables, 15 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Renata Teparić, PhD, associate professor

Technical support and assistance: Mateja Lozančić, MSc

Defence date: July, 2017.

Tablica sadržaja

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Kratka povijest kloniranja fragmenata DNA	2
2.2. Strategije kloniranja	3
2.3. Optimiranje PCR-a	4
2.4. Kloniranje s kohezivnim krajevima	8
2.5. Kloniranje s ravnim krajevima	10
2.6. Usporedba sastava komercijalno dostupnih kitova za kloniranje i utjecaj na kvalitetu kloniranja	12
2.7. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.7.1. Scw4 protein	16
3. Eksperimentalni dio	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Kemikalije i uređaji	17
3.1.2. Nukleotidi	18
3.1.3. Plazmidi	18
3.1.4. Soj bakterije	20
3.2. Metode	21
3.2.1. Konstrukcija inserta $\Delta 246$ <i>SCW4</i>	21
3.2.2. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu	25
3.2.3. Pročišćavanje fragmenata DNA umnoženih PCR-om	25
3.2.4. TA-ligacija fragmenta DNA	25
3.2.5. Transformacija kompetentnih stanica bakterije <i>Escherichia coli</i>	27
3.2.6. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije <i>Escherichia coli</i> („mini-prep“)	27
3.2.7. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima	27
4. Rezultati	28
4.1. Konstrukcija fragmenta $\Delta 246$ gena <i>SCW4</i>	28
4.2. Kloniranje gena <i>SCW4</i>	29
5. Rasprava	31
6. Zaključci	33
7. Literatura	34

1.Uvod

70-ih godina prošlog stoljeća znanstvenici su počeli razmatrati mogućnost spajanja dviju DNA molekula u jednu. Danas je to široko korištena baza za većinu znanstvenih istraživanja na području molekularne genetike (Zhang i sur., 2004). Ovim jednostavnim načinom moguće je amplificirati željeni fragment DNA konstruiran pomoću PCR-a za daljnje korake u istraživanju. Krajevi fragmenata strane DNA spoje se pomoću enzima DNA ligaze s krajevima vektorske DNA i na taj način dobije se cirkularna rekombinantna DNA. Takvom DNA moguće je transformirati određeni kompetentni soj stanica mikroorganizma. Jedan od najčešćih modelnih mikroorganizama u genetičkim istraživanjima je *Escherichia coli* i do sad su konstruirani i sekvencirani njeni brojni mutanti (Lukjacenکو i sur., 2010).

Uspješno kloniranje je moguće provesti s fragmentima veličine čak do 13kb s raznim nukleotidnim sekvencama. Glavne metode kloniranja su kloniranje s ravnim i kloniranje s kohezivnim krajevima. Ovisno o mogućnostima i osobinama samog gena bira se metoda koja je optimalna. Iako su obje metode učinkovite, učinkovitija je ipak metoda kloniranja sa kohezivnim krajevima (do 100 puta) zbog stabilnosti reakcijskog sustava i pouzdanosti ligacije. Prvi korak kod kloniranja je umnažanje fragmenta DNA kojeg se želi klonirati pomoću PCR metode. Ona omogućuje brzo i efikasno amplificiranje željenog (dijela) gena. U ovom radu je pomoću PCR-a konstruiran fragment gena *SCW4* kvasca *Saccharomyces cerevisiae* delecijom dijela gena koji kodira za 246 aminokiseline na N-terminalnom kraju proteina Scw4. Nakon toga taj DNA fragment je povezan metodom TA-ligacije s lineariziranim plazmidnim vektorom pGem-T Easy. Gen je kloniran u kompetentne stanice *Escherichie coli* te su izolirani transformanti. Daljnjom restrikcijskom analizom i elektroforezom je potvrđena uspješnost kloniranja.

2. Teorijski dio

2.1. Kratka povijest kloniranja fragmenata DNA

Brojna znanstvena otkrića na području molekularne biologije prikupljena do 1970. godine, koja su se odnosila na nasljeđivanje u živih bića, omogućila su da se počne istraživati mogućnost *in vitro* spajanja dviju molekula DNA dobivenih iz različitih organizama te unošenja tako dobivene hibridne molekule DNA u stanicu domaćina gdje bi izrazila svoje svojstvo. Jedna od temeljnih spoznaja koje su omogućile ovakva istraživanja bilo je razjašnjenje strukture DNA i njezine uloge u nasljeđivanju. J. D. Watson i F. H. Crick su 1953. godine načinili model strukture DNA molekule. F. Jacob, A. Lwoff i J. Monod otkrili su postojanje kontrole ekspresije gena u stanici na temelju pručavanja *Lac* operona u kodirajućim regijama DNA *E. coli*. Za to otkriće su 1965. godine podijelili Nobelovu nagradu.

Proučavanje uloge molekule DNA u nasljeđivanju metodama klasične genetike nije uvijek bilo jednostavno. Osnovni problem bio je u veličini molekula DNA kao sastavnog dijela kromosoma. Stoga se postavilo pitanje na koji način dobiti manje dijelove ili fragmente DNA koji bi poslužili za proučavanje, a da se pri tome ne izgubi njezina funkcija.

1972. godine je Paul Berg koristeći enzime koji cijepaju DNA ubacio novi odsječak DNA u već postojeći lanac DNA, čime je nastala prva rekombinantna DNA molekula.

1973. godine su Stanley Cohen i Herbert Boyer uspješno ubacili DNA iz stanica jedne vrste u genom stanica druge vrste što je bio prvi uspješan pokušaj genetičkog inženjerstva. Zbog njihovih istraživanja na otkriću rekombinantne DNA, općenito poznatog kao kloniranje gena, često ih se naziva "očevima biotehnologije". Iz njihovog je otkrića proizašla mogućnost za razvoj različitih metoda liječenja čitavog niza bolesti i poremećaja, poput sinteze ljudskog inzulina, otkrivanje spoja za otapanje krvnih ugrušaka kod osoba koje su pretrpjele srčani ili moždani udar, sinteze ljudskog hormona rasta, te interferona za oboljele od raka (Fairbanks, 2004) .

1975. godine su na konferenciji u Asilomaru znanstvenici zatražili privremeni prekid pokusa s rekombinantnom DNA dok se ne riješe pitanja sigurnosti i analiziraju moguće posljedice. Nakon toga je ustanovljen Komitet za rekombinantnu DNA kojem je zadaća ispitivanje dopustivosti svakog pokusa koju uključuje rekombinantnu DNA.

Iste godine Edward Southern je osmislio metodu „Southern blot“. To je metoda koja omogućuje da se željeni DNA fragment detektira u smjesi DNA molekula pomoću specifičnog oligonukletidnog lanca (tzv. DNA sonde) čiji je slijed nukleotida komplementaran slijedu nukleotida u fragmentu koji se želi detektirati, pa se stoga može specifično vezati na njega. Pri

tome je DNA sonda obilježena radioaktivnim fosfatom ili na neki drugi način (npr. biotinom, alkalnom fosfatazom, peroksidazom i sl.) što omogućuje njenu detekciju nakon vezanja. U prvom koraku se DNA molekule iz smjese međusobno odijele elektroforezom nakon čega slijedi prijenos DNA fragmenata na nitroceluloznu ili najlonsku membranu, hibridizacija sa odgovarajućom označenom DNA sondom, ispiranje suviška nevezane DNA sonde puferom te naposljetku detekcija hibridizacijskog signala (Sambrook i Green, 2012).

1976. godine Boyer i Robert Swanson utemeljili su prvu biotehnološku tvrtku, Genentech, koja i danas posluje.

1979. godine riješen je još jedan važan biološki fenomen nazvan restrikcijsko-modifikacijski sustav koji je pronađen u bakteriji *E. coli*, a kasnije otkriven i u brojnim drugim mikroorganizmima. Proučavanje tog sustava dovelo je do otkrića posebnih enzima nazvanih restrikcijskim endonukleazama, a koji su imali ključnu ulogu u tehnologiji rekombinantne DNA. Postupak restrikcije i modifikacije DNA otkrio je švicarski znanstvenik Werner Arber, koji je za to otkriće 1978. godine podijelio Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju s amerikancima D. Nathansom i H. Smithom.

1981. je na Sveučilištu Ohio rođena prva transgenična životinja, točnije miš čiji je genom sadržavao ubačenu stranu DNA.

1983. Karry Mullis je osmislio metodu PCR, kojom se u kratkom vremenu moglo eksponencijalno umnožiti određeni odsječak DNA.

1990. započeo je Projekt ljudskog genoma (HUGO), pothvat golemih razmjera kojem je svrha čitanje svih 3 milijarde parova baza koje tvore ljudski genom. 2003. HUGO projekt je završio.

Iste godine W. French Anderson je izveo prvu uspješnu gensku terapiju na 4-godišnjakinji koja je bolovala od adenozin deaminazne deficijencije koja joj je onemogućavala uspješnu obranu od infekcija. Iz njene krvi izolirane su bile bijele krvne stanice u koje je retrovirusom ugrađen gen za adenozin deaminazu te su stanice ponovno vraćene u organizam djevojčice. Ekspresijom tog gena u bijelim krvnim stanicama sintetizirana je adenozin deaminaza te je djevojčica izliječena.

2.2. Strategije kloniranja

Samostalna replikacija jedne molekule rekombinantne DNA počinje u stanici majci, a nastavlja se u potomcima te stanice. Pri tome od svake pojedine molekule nastaje mnoštvo njoj identičnih molekula. Takav način umnažanja rekombinantne DNA, i stranih gena koje

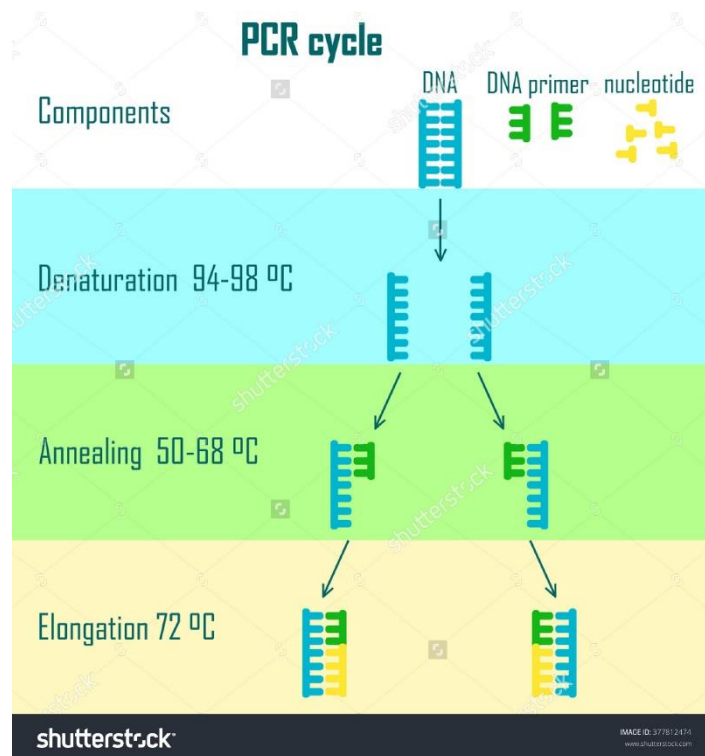
rekombinantna DNA u sebi nosi, naziva se kloniranje DNA ili kloniranje gena. Strana DNA pocijepa se na određenim mjestima pomoću odgovarajućeg restrikcijskog enzima, a pomoću istog ili nekog drugog enzima napravi se barem jedan dvolančani lom na određenom mjestu u cirkularnoj molekuli plazmidne DNA (Lodish i sur., 2013). Krajevi fragmenata strane DNA (insert) spoje se pomoću enzima DNA ligaze sa krajevima linearizirane plazmidne DNA (vektor) i na taj način dobije se cirkularna rekombinantna DNA. DNA ligaza ligira isturene krajeve ili ravne krajeve inserta i vektora. DNA sa isturenim krajevima ima nesparene nukleotide na kraju jednog od lanaca DNA, a DNA s ravnim krajevima je ona DNA koja nema nesparenih nukleotida na svojim krajevima. Bitno je da su krajevi gena kojeg želimo umnožiti i plazmidnog vektora iste vrste kako bi se mogli ligirati. Primjerice, ako krajevi vektora sadrže ravne krajeve potrebno je i krajeve inserta pretvoriti u ravne (ako već nisu) kako bi ligacija bila uspješna. Ako insert (ili vektor) sadrži isturene krajeve onda i vektor (ili insert) mora imati krajeve koji su im komplementarni kako bi se mogli ligirati. Iz tog razloga se vektor i insert pocijepaju istim enzimom/ima koji ostavlja/ju isturene komplementarne krajeve. Ukoliko isturene krajeve treba prevesti u ravne koriste se enzimi egzonukleaze koji pocijepaju nesparene jednolančane isturene krajeve molekule i na taj način ih pretvaraju u ravne. Druga mogućnost da se istureni krajevi prevedu u ravne je da se pomoću enzima polimeraze dodaju nukleotidi na kraći lanac DNA molekule sve dok se dobiju ravni krajevi. Rekombinantna DNA (novi plazmid) unosi se u bakterijske stanice, koje su prethodno manipulirane tako da postanu propusne za DNA iz okoliša (tzv. kompetentne stanice). Nakon unošenja, rekombinantna DNA se replicira u bakterijskoj citoplazmi, dok se bakterije istodobno množe.

Kloniranje se koristi za određivanje sekvence DNA, pripremu knjižnica DNA molekula, proučavanje ekspresije kodirajuće DNA, stvaranje sintetičkih gena i genoma i mnoge druge primjene (Lodish i sur., 2000). Ovaj će se rad baviti kloniranjem mutiranog gena iz stanice kvasca *S. cerevisiae*, dobivenog PCR metodom, u stanicama *Escherichia coli* pomoću plazmidnog vektora pGem-T Easy.

2.3. Optimiranje PCR-a

PCR (Polymerase Chain Reaction) je metoda kojom se umnaža točno određena sekvenca DNA iz male količine genetičkog materijala. Postupak se bazira na principu da se dvolančana DNA pri određenoj temperaturi (tzv. temperatura denaturacije) razdvoji na dva pojedinačna lanca te se nakon spuštanja temperature na tzv. temperaturu sparivanja ("annealing temperature") kratki oligonukleotidni lanci (tzv. početnice) vežu na jednolančane kalupe DNA na mjestima na

kojima su im sekvence komplementarne. Nakon toga se temperatura podešava na optimalnu temperaturu za aktivnost DNA polimeraze koja zatim sintetizira, počevši od krajeva sparenih početnica, novi lanac DNA komplementaran kalupu (Slika 1).



Slika 1. Opća shema odvijanja PCR metode. Komponente reakcijske smjese su DNA kalup, DNA početnice i nukleotidi. Prva faza ciklusa je denaturacija DNA kalupa pri temperaturama od 94°C do 98°C, nakon čega slijedi faza komplementarnog sparivanja početnica i kalupa DNA pri temperaturama od 50°C do 68°C. Zadnja faza je faza elongacije odnosno sinteze novih DNA lanaca komplementarnih DNA kalupu. (<https://image.shutterstock.com/z/stock-vector-pcr-cycle-scheme-showing-dna-molecule-on-different-stages-377812474.jpg>, pristupljeno: 20.6.2017.)

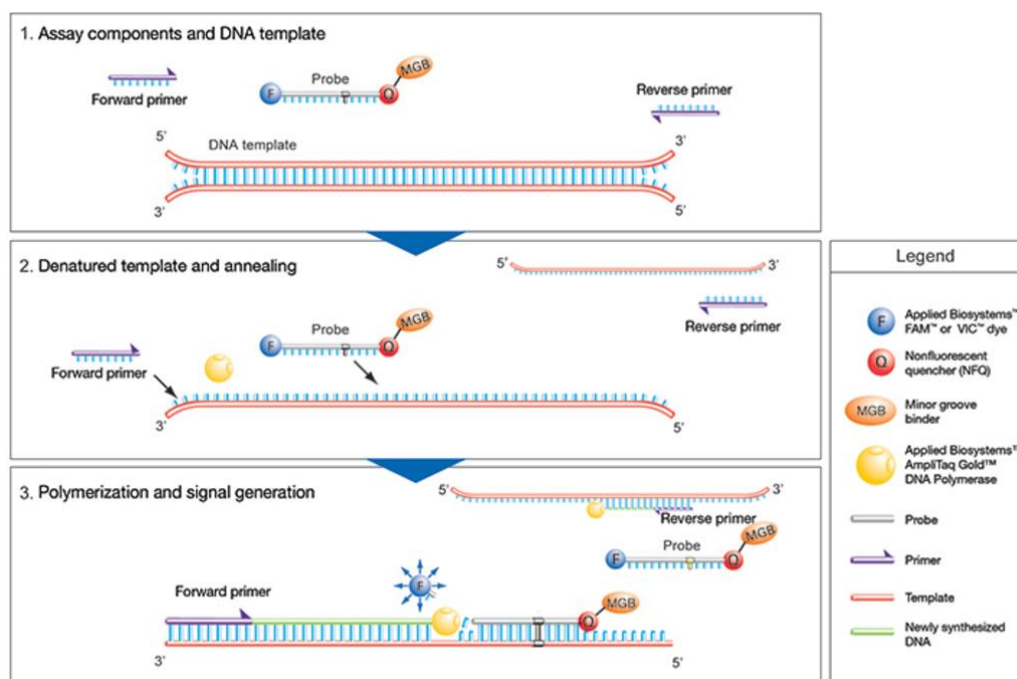
Reakcijska otopina sastoji se od DNA kalupa koji sadrži sekvencu od interesa, odgovarajućih početnica koje se sintetiziraju posebno za sekvencu koju želimo umnožiti, termostabilne DNA polimeraze, pufera za DNA polimerazu te smjese sva četiri deoksiribonukleotida koje će polimeraza koristiti kao supstrate za sintezu DNA. Metoda se sastoji od inicijalne denaturacije lanaca, ciklusa od tri segmenta u kojem se izmjenjuju temperature i duljina trajanja pojedinog segmenta, te završne elongacije. Inicijalna denaturacija tj. razdvajanje lanaca dvolančane DNA odvija se pri temperaturi od 93°C do 95°C (tzv. temperaturi taljenja T_m) i obično traje od 30 sekundi do nekoliko minuta, ovisno o vrsti DNA koja se koristi kao kalup (genomska DNA, plazmidna DNA ili kraći fragment DNA). Nakon toga slijede ciklusi u kojima se izmjenjuju komplementarno sparivanje početnica i kalupa, elongacija i razdvajanje novosintetiziranih lanaca DNA. Komplementarno sparivanje početnica i kalupa DNA odvija se pri temperaturi 5°C

do 20°C nižoj od temperature taljenja (T_m). Temperatura potrebna za komplementarno sparivanje DNA kalupa i početnice ovisi o duljini početnice (izražava se u broju nukleotida N) i udjelu GC parova baza (%GC) te se računa prema empirijskoj formuli : $T_m = 60,32 + 0,41 * (\%GC - 600/N)$. Ovaj segment se obično odvija u trajanju od 1 do 2 minute. Zadnji segment u ciklusu je sinteza DNA pri temperaturama 70°C do 72°C, ovisno o optimalnoj temperaturi za DNA polimerazu koja se koristi, a vrijeme trajanja elongacije ovisi o duljini fragmenta koji se umnaža. U prosjeku je za sintezu jedne kilobaze DNA potrebna 1 minuta. Nakon toga slijedi denaturacija novosintetiziranih lanaca DNA pri 95°C kroz 30 sekundi. Kako bi se umnožio dovoljan broj kopija željenog fragmenta faze komplementarnog sparivanja početnica s kalupom, elongacije i razdvajanja komplementarnih lanaca DNA se ponavljaju u ciklusima 25 – 35 puta. Umnožavanje se odvija eksponencijalno. Premali broj ciklusa može uzrokovati da se premalo produkta generira do kraja reakcije. Preveliki broj ciklusa može uzrokovati značajno umnažanje neželjenih produkata kojih bi se u manjem broju ciklusa umnožilo zanemarivo malo. Idealan broj ciklusa je nekad potrebno empirijski odrediti. Postupak završava tzv. završnom elongacijom, koja traje otprilike 10 minuta, tijekom koje se produljuju svi eventualno nezavršeni krajevi novosintetizirane DNA.

Pri planiranju provedbe PCR-a postoji nekoliko stavki koje se moraju uzeti u obzir. Temperatura taljenja i temperatura sparivanja početnice sa kalupom moraju biti optimizirana u ovisnosti o kalupu DNA koji se koristi i svojstvima početnica. U pravilu, temperature nešto više od temperature sparivanja dobivene proračunom dovode do specifičnijeg vezivanja početnica na lanac DNA, a temperature niže od 20°C ispod izračunate temperature taljenja povećavaju mogućnost pogrešnog (nespecifičnog) sparivanja. Temperatura sparivanja izravno ovisi o udjelu GC baza jer su gvanin i citozin povezani s tri vodikove veze i potrebno je uložiti više energije kako bi se veze „pokidale“. Također, postoji mogućnost nastajanja sekundarne strukture, primjerice tzv. „stem loop“-a povezivanjem baza istog lanca jednolančanog kalupa DNA koje se u reakcijskoj smjesi nađu nasuprotno u fazi denaturacije. Nastajanje „stem loop“-a događa se u slučaju odvijanja PCR-a pri preniskoj temperaturi denaturacije. Nadalje, na uspješnost PCR reakcije utječe koncentracija enzima DNA polimeraze, količina kalupa DNA, magnezijevih iona te slobodnih dNTP-ova, dok negativno mogu utjecati inhibitori DNA polimeraze kao što su npr. kelatni ioni ili organska otapala.

Osim ovog standardnog postoji još niz protokola za korištenje PCR metode u svrhe genetičkog inženjerstva. Jedna takva metoda je „Taq man“ metoda gdje se osim specifičnih početnica koriste fluorescentno označeni oligonukleotidi (tzv. TaqMan probe) koji se vežu na odgovarajuću regiju unutar dijela DNA koji se umnaža te omogućuju kvantitativno mjerenje udjela određenih genskih sekvenci u nekom uzorku DNA. Taq polimeraza sintetizira novi lanac

komplementaran starom te razgrađuje "TaqMan probu", koja se nalazi vezana komplementarno za jednolančani kalup DNA, pri čemu nastaje fluorescencija koja se detektira (Slika 2). Detektirana fluorescencija proporcionalna je broju kalupa DNA prisutnih u reakcijskoj smjesi što omogućuje kvantifikaciju novosintetiziranih lanaca DNA odnosno novonastalih DNA molekula.

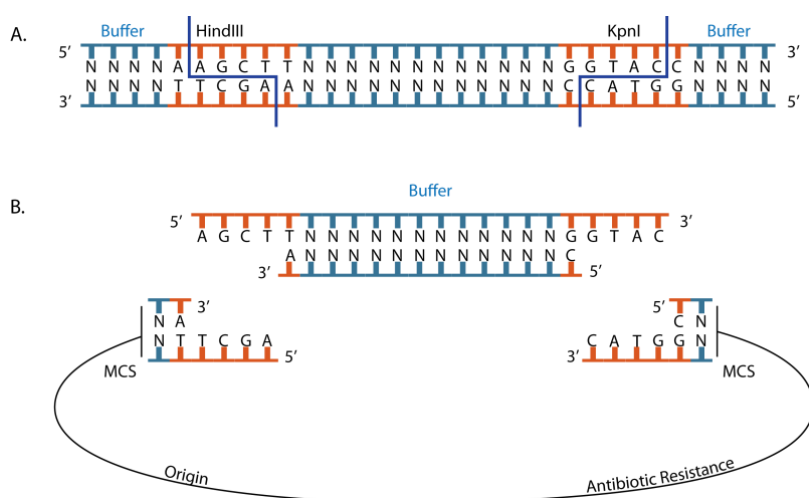


Slika 2. Shematski prikaz „Taq man“ PCR metode. 1. dio prikazuje sastavnice smjese PCR-a i DNA kalup. 2. dio prikazuje denaturaciju dvolančanog DNA kalupa povišenjem temperature te komplementarno sparivanje početnica za kalup smanjenjem temperature reakcijske smjese. Za vrijeme povezivanja početnica na kalup se također veže i TaqMan proba na specifične sekvence kalupa. Proba sadrži fluorescentnu boju na 5' kraju, čiji je signal zasjenjen tzv. quencher-om koji se nalazi na 3' kraju probe. 3. dio prikazuje polimerizaciju pomoću Taq polimeraze od početnice prema TaqMan probi. Kada Taq polimeraza dođe do probe njezina endonukleazna podjedinica razgradi probu na taj način razdvajajući fluorescentnu boju od quencher-a pri čemu dolazi do fluorescencije. (<http://www.dnvision.com/images/RSE/TaqMan-GenotypingAssay.jpg>, pristupljeno: 23.6.2017.)

Još jedna metoda je Randomly Amplified Polimorphic DNA PCR (RAPD-PCR). Princip te metode je provođenje PCR-a pri uvjetima kojima je omogućeno manje specifično sparivanje početnica i kalupa dodavanjem kraćih početnica (8-12 pb) koje se mogu vezati na više mjesta unutar sekvence kalupa DNA čime se dobiju kopije različitih gena. Ta metoda se koristi u genetičkom mapiranju.

2.4. Kloniranje s kohezivnim krajevima

Kod kloniranja dvolančanog DNA fragmenta u plazmidni vektor prvo se DNA cijepa restriktivnim enzimima i fragmenti se ugrade u vektor pomoću DNA ligaze. Kao što je već spomenuto vektor i insert su pocijepani istim restriktivnim enzimima kako bi se njihovi krajevi uspješno ligirali. Restriktivne endonukleaze prepoznaju i cijepaju dvolančanu DNA na specifičnim nukleotidnim sekvencama odnosno restriktivnim mjestima. Većina restriktivskih enzima ostavlja kratke isturene ili uvučene krajeve na 5' ili na 3' kraju jednog od lanaca nakon cijepanja dvolančane DNA. Takvi krajevi mogu biti spojeni DNA ligazom pri čemu se obnavlja originalno restriktivsko mjesto (Slika 3).

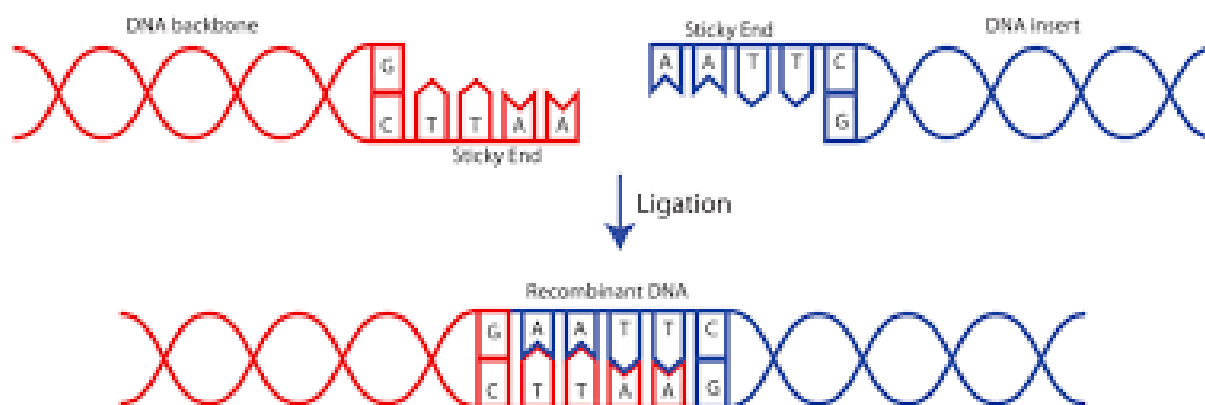


Slika 3. Shematski prikaz cijepanja restriktivnim enzimom koji ostavlja isturene krajeve. A) DNA fragment i na njemu označena mjesta cijepanja restriktivnim enzimima HindIII i KpnI koji ostavljaju isturene krajeve nakon cijepanja. **B)** DNA fragment pocijepan s navedena dva enzima (HindIII i KpnI) te vektor također pocijepan s istim enzimima. Vektor sadrži ishodište replikacije, gen za rezistenciju na antibiotik te Multiple Cloning Site (MCS) u kojem su restriktivska mjesta za HindIII i KpnI.

(<http://www.idtdna.com/pages/images/decoded/cohesive-ends.png?sfvrsn=0>, pristupljeno: 12.6.2017.)

Nazvani su kohezivni krajevi jer se vodikovim vezama stabiliziraju DNA baze komplementarnih lanaca koje onda pridržavaju krajeve molekule DNA skupa do ligacije (Anonymous, 2017). Stabilizacijom kohezivnih krajeva vodikovim vezama povećava se efikasnost ligacije za više od 100 puta u odnosu na ligaciju s ravnim krajevima (Surzicky, 2000). Kloniranje s kohezivnim krajevima se događa na temelju dvaju principa. Prvi je da se isto restriktivsko mjesto pojavljuje i u insertu i u Multiple Cloning Site-u (MCS) vektora i nigdje drugdje u vektoru i insertu. MCS ili polilinker je kratka sekvenca DNA koja je umjetno stvorena genetičkim metodama u plazmidnom vektoru i sadrži velik broj restriktivskih mjesta koja se jedinstveno nalaze samo u

MCS-u i nigdje drugdje u cijelom vektoru. Drugi princip je da su insert i plazmid pocijepani u odvojenim reakcijskim smjesama koristeći isti enzim. Poslije cijepanja, vektor je defosforiliran kako bi se spriječila slučajna recirkularizacija plazmidnog vektora. Kada se uklone fosfati s krajeva DNA onda DNA ligaza ne može povezati 3' hidroksilnu skupinu i 5' fosfatnu skupinu s krajeva DNA jer te fosfatne skupine nema. U preostalim koracima, insert se ligira u vektor te se s takvim ligiranim plazmidom transformiraju kompetentne stanice. Svaki plazmidni vektor mora sadržavati tri osnovne stvari kako bi kloniranje bilo provedeno uspješno. Prva bitna stavka je da vektor sadrži ishodište replikacije kako bi se plazmid mogao replicirati u stanici domaćina. Drugo je MCS unutar kojega se ubacuje insert u vektor. Treće, plazmid mora sadržavati barem jedan gen za rezistenciju na određeni antibiotik kako bi se transformirana stanica mogla selektirati od drugih netransformiranih stanica na selektivnim hranjivim podlogama. Za različite aplikacije u molekularnoj biologiji najčešće postoji više komercijalnih vrsta vektora, tako da treba usporediti prednosti i nedostatke svakog od njih da bi odabrali vektor koji najbolje odgovara za određenu primjenu. Na uspješnost kloniranje utječe i veličina fragmenta. Potrebno je provjeriti u uputama proizvođača vektora koje veličine inserta su dozvoljene za pojedine vektore i vrste kloniranja. Općenito, manje inserte (duljine do 1 kb) lakše je klonirati nego veće (veće od 3kb). Veće fragmente je teže klonirati zbog toga što je veća mogućnost da sadrže više jednakih restrikcijskih mjesta što limitira odabir enzima, ali i zbog toga što je manja vjerojatnost da se odgovarajući krajevi inserta i vektora u reakcijskoj smjesi nađu dovoljno blizu za ligaciju. Kovalentno povezivanje krajeva inserta i plazmidne DNA izvodi se pomoću ATP ovisne T4 DNA ligaze (Slika 4).



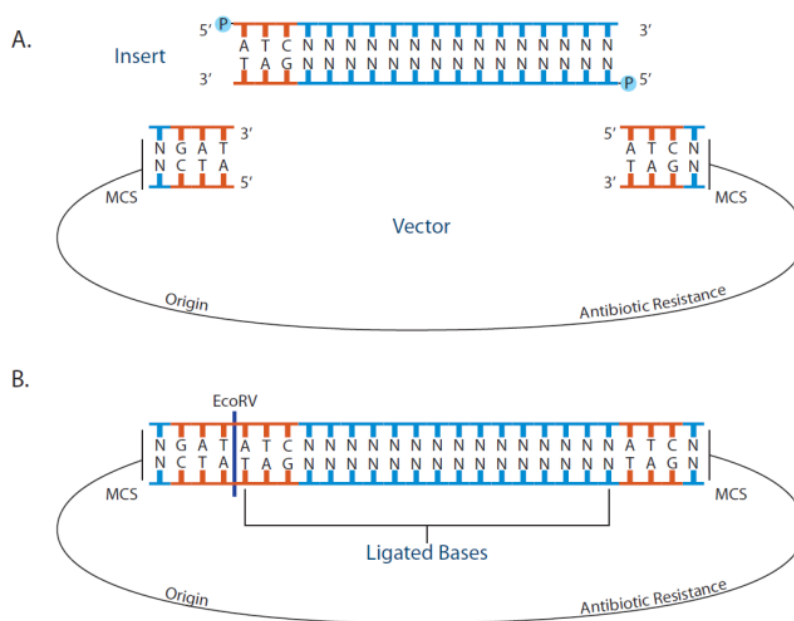
Slika 4. Shematski prikaz procesa ligacija uz pomoć T4 DNA ligaze. Crvenom bojom je prikazan dio molekule DNA vektora, a plavom bojom je prikazan dio DNA molekule inserta, svaki sa svojom nukleotidnom sekvencom koje se međusobno preklapaju („lijepe“). Ligacijom preklapajućih regija iz dvije DNA molekule nastaje jedna rekombinantna DNA molekula. (https://media.addgene.org/data/easy-thumbnails/filer_public/cms/filer_public/21/27/212780f6-b140-440b-b414-

[1ec4353167d6/ligation.gif_900x316_q85_crop_subsampling-2_upscale.png](#), pristupljeno: 15.5.2017.)

Ligacija se općenito provodi pri temperaturama između 4° i 25° C jer u tom temperaturnom rasponu različite komercijalno dostupne DNA ligaze imaju optimalnu aktivnost. Trajanje ligacije se isto razlikuje za različite DNA ligaze od nekoliko minuta na temperaturama od 20 -25° C pa do više sati ili preko noći na 16°C ili 4°C. Kako bi se izbjegla inhibicija ligaze u reakcijskim smjesama se izbjegava prisutnost organskih otapala kao što su etanol ili fenol, te glicerol u višim koncentracijama. U svrhu konstruiranja plazmida sa željenim insertom i sprječavanja stvaranja neželjenih sekundarnih produkata kao konkatamera, ukupna koncentracija DNA u ligacijskoj smjesi bi trebala biti manja od 10 µg/mL. Konkateri nastaju takozvanom replikacijom „kotrljajućeg kruga“ u bakterijama koje su inficirane fagima i zapravo su dugačke DNA molekule s puno ponavljajućih sekvenci. Za ligaciju kohezivnih krajeva, potreban je vrlo mali omjer inserta i vektora (3:1, 5:1) (Sambrook i Green, 2012).

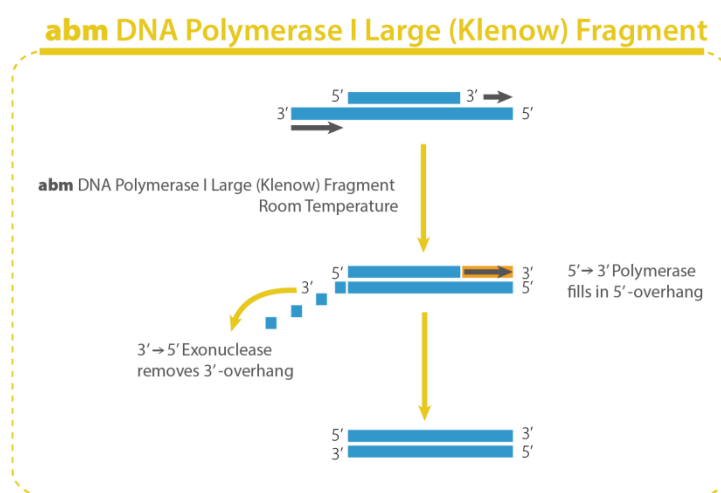
2.5. Kloniranje s ravnim krajevima

Kloniranje s ravnim krajevima podrazumijeva ligaciju dvolančane DNA u plazmid kada linearizirani vektor i insert nemaju baze koje bi se mogle „preklopiti“ na svojim uvučenim, odnosno isturenim krajevima kao kod kohezivne ligacije. Budući da nema stabilizacije vodikovim vezama kao u kohezivnoj ligaciji, dovoljno je da postoji dostupan 5' i 3' kraj kako bi T4 DNA ligaza povezala baze na krajevima lanaca (Slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz cijepanja restriktivnim enzimom koji ostavlja ravne krajeve. **A)** Prikazan je DNA fragment koji je nastao cijepanjem na jednom mjestu restriktivnim enzimom EcoRV i vektor koji sadrži ishodište replikacije, gen za rezistenciju na antibiotik te je pocijepan u MCS-u s enzimom EcoRV. **B)** Ligacijom se na lijevom kraju obnavlja restriktivsko mjesto za EcoRV dok se na desnom kraju ne obnavlja jer taj kraj nije nastao cijepanjem s EcoRV. (http://www.idtdna.com/pages/images/decoded/cc_blunt-end-cloning_fig-1.png?sfvrsn=0 , pristupljeno: 12.6.2017.)

Kloniranje s ravnim krajevima ima svoje prednosti i nedostatke u odnosu na kohezivnu ligaciju. Postoji nekoliko ograničenja ligacije s ravnim krajevima: efikasnost u odnosu na prije opisanu metodu je 10-100x manja; određeni udio ligiranih molekula ima insert u pogrešnoj orijentaciji; neke ligirane molekule uopće nemaju insert već dolazi do recirkularizacije početnog plazmida dok neke imaju višestruki broj inserata (Lodish i sur., 2013). Vektor i insert se pripremaju za ligaciju digestijom sa restriktivnim enzimom koji ostavlja ravne krajeve, kao što je primjerice EcoRV. Restriktivsko mjesto koje ostavlja ljepljive krajeve se također može koristiti, ali se dobiveni krajevi moraju poslije pomoću egzonukleaza ili polimeraza pretvoriti u ravne krajeve (tzv. "poliranje"). Međutim, osnovni nedostatak ove metode je u tome što ne postoji pouzdani način na koji bi se procijenio uspjeh reakcije „poliranja“ odnosno uklanjanja ili nadopunjavanja baza do nastanka ravnih krajeva DNA fragmenta. Enzim koji se koristi u svrhu "poliranja" je Klenow fragment DNA polimeraze I koji će popuniti nedostajuće baze ako postoji slobodna hidroksilna grupa na 3' kraju lanca DNA, pomoću svoje 5'-3' polimerazne aktivnosti (Slika 6). Također će ukloniti isturene krajeve s 3' kraja pomoću svoje 3'-5' egzonukleazne aktivnosti.



Slika 6. Shematski prikaz aktivnosti Klenowog fragmenta. Gornji dio slike prikazuje DNA fragment s isturenim krajevima. Srednji dio slike prikazuje kako se pri sobnoj temperaturi uz prisustvo Klenow fragmenta egzonukleaznim djelovanjem Klenow fragmenta u smjeru 3'-5' degradira 3' istureni kraj. Polimerazno djelovanje Klenow fragmenta u smjeru 5'-3' rezultira popunjavanjem kraćeg lanca nukleotidima komplementarnim 5' isturenom kraju.

(https://www.abmgood.com/Enzymes/images/Klenow_Frag_v2.png, pristupljeno: 12.6.2017.)

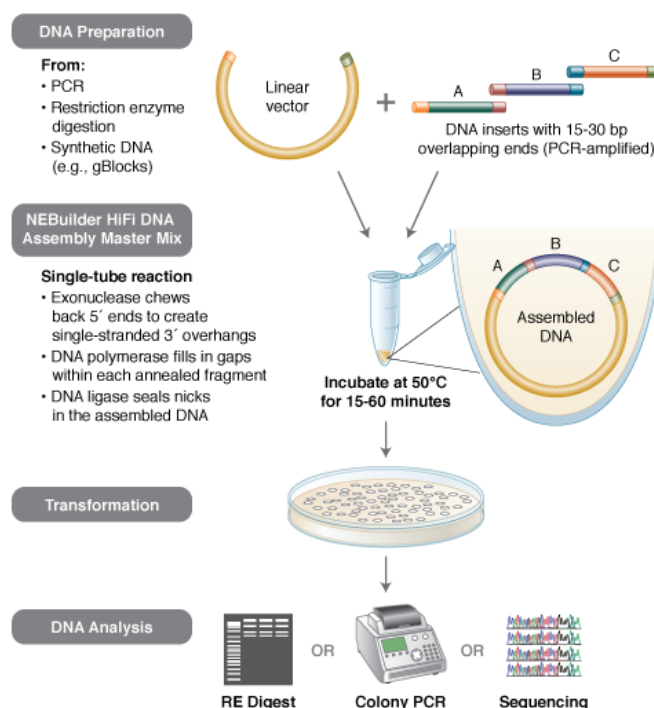
Alternativno, DNA fragment može se pripremiti umnažanjem pomoću Pfu polimeraze ("polimeraza visoke vjernosti") izolirane iz hipertermofilne arheje *Pyrococcus furiosus*. Standardne polimeraze čitaju DNA kalup, odabiru komplementarni nukleozid trifosfat te ugrađuju nukleotide na 3' kraj rastućeg lanca, dok Pfu polimeraza osim toga ima i 3'-5' egzonukleaznu aktivnost kojom svaki pogrešno ugrađeni nukleotid izrezuje i ugrađuje točni umjesto njega. Rezultat korištenja ovakve polimeraze je točnije repliciran DNA kalup u odnosu na primjenu standardne polimeraze. Plazmid se uobičajeno defosforilira kao i kod kloniranja s kohezivnim krajevima.

2.6. Usporedba sastava komercijalno dostupnih kitova za kloniranje i utjecaj na kvalitetu kloniranja

Većina različitih komercijalno dostupnih kitova za kloniranje koristi istu temperaturu od 25°C i vrijeme od 5 minuta za ligaciju inserta i vektora kod kloniranja s ravnim i kod kloniranja s kohezivnim krajevima. Inkubacija iznad tog vremena ne donosi nikakav benefit. Dapače, produljenjem inkubacije preko noći efikasnost se smanjuje za 75% jer se dio enzima razgradi pa je koncentracija enzima manja u odnosu na koncentraciju ATP-a koji inhibira preostalu nerazgrađenu DNA ligazu. Ukupna koncentracija vektora i inserta bi trebala biti između 1-10 µg/mL za uspješnu ligaciju. Omjer vektora i inserta između 1:2 i 1:6 jamče optimalnu razinu ligacije, dok omjer ispod 1:2 rezultira smanjenom efikasnosti, a omjer iznad 1:6 potiče nastajanje višestrukih inserata u jednom vektoru. Koncentracija T4 DNA ligaze je različita kod kloniranja s ravnim i kohezivnim krajevima. Tipično se za 20 µL reakcijske smjese kod ligacije s ravnim krajevima koristi 3 U enzima T4 DNA ligaze, dok se kod ligacije sa ljepljivim krajevima koristi 1 U T4 ligaze. 1 Internacionalna jedinica (Unit; U) je količina enzima koja prevede u produkt 1 µmol supstrata u 1 min. Što se tiče pufera za ligaciju, najčešće se koristi 1,0 M Tris-HCl pufer pH 7,4 za očuvanje fiziološkog pH. Nadalje, u sastavu pufera se nalaze i MgCl₂ i ATP bez kojih ligaza ne može djelovati. Također ligazi je potreban i ditionitrol (DTT) koji sprječava smanjenje njezine aktivnosti uslijed gubitka native konformacije do koje bi moglo doći oksidacijom Cys-ostataka i stvaranjem disulfidnih mostova. Ligaza se može inaktivirati namjerno pri 65°C tijekom 10 minuta. Međutim, ako ligaciju odmah slijedi transformacija elektrokompetentnih stanica, a pufer za ligazu sadrži i polietilenglikol tada je osim inaktivacije ligaze potrebno ukloniti i polietilenglikol jer je dokazano da je u prisustvu polietilenglikola

transformacija usporena do 260 puta (Michelsen, 1995). Polietilenglikolne molekule su velike i amfipatske pa se vežu pozitivnim krajevima za negativno nabijenu DNA time ometajući prolazak DNA kroz mikropore stanice. Unatoč tom negativnom efektu neki puferi sadrže polietilenglikol u manjim koncentracijama kako bi se spriječila inaktivacija ligaze za vrijeme čuvanja u hladnjaku pri -20°C. Što se tiče same transformacije stanica najčešće se to izvodi elektroporacijom ili takozvanim „heath shockom“, a cilj obje metode je stvaranje mikropora na staničnoj stijenci. U velikom broju slučajeva sama *E. coli* se učini kompetentnom preko „heath shocka“ uz dodatak iona kao što su Mn^{2+} , Ca^{2+} , Rb^{+} ; kao i DTT, heksamin kobalt (III) i DMSO (dimetil sulfoksid). Većina laboratorija provodi uzgoj transformanata na LB tekućoj podlozi, no nju bi trebalo zamijeniti sa nekom bogatijom podlogom kao što je SOC medij za bolji učinak transformacije (Hanahan, 1983).

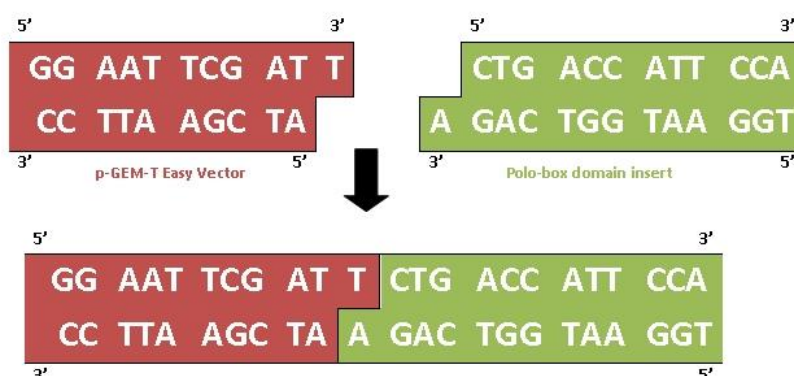
Mali broj kitova za kloniranje podržava kloniranje sa ravnim i sa ljepljivim krajevima. Takav kit je NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning kit (New England Biolabs) koji klonira fragmente DNA bez obzira na duljinu ili na kompatibilnost krajeva. Ovim kitom je moguća ligacija fragmenta veličine do 12 kb u 7 kb dugi vektor, a može se koristiti za ligiranje jednolančanih DNA fragmenata ili DNA fragmenata različitih duljina s preklapanjima (isturenim krajevima) dugim od 15pb do 80pb. Kit omogućuje kloniranje nekoliko različitih inserata u jedan vektor u jednom koraku što štedi vrijeme i materijale. Tako je u jednom koraku moguće klonirati do 11 inserata dugih 0,4 kb u jedan vektor s pravom orijentacijom, no preporučljivo je ligirati maksimalno 4-5 inserata različitih duljina u jedan vektor kako bi uspješnost reakcije bila garantirana. Mehanizam reakcije uključuje tri različita enzima koji djeluju u istoj reakcijskoj smjesi (u jednoj „Eppendorf-ici“). Egzonukleaza degradira 5' krajeve DNA, ostavljajući jednolančane 3' isturene krajeve, što olakšava „lijepljenje“ (preklapanje) komplementarnih baza. T4 DNA polimeraza popunjava praznine u smjeru 5'-3' (između preklapljenih fragmenata postoje praznine gotovo uvijek) koristeći svoju polimeraznu domenu. Nadalje, T4 DNA ligaza ligira dvolančane lomove između inserta (inserata) i vektora u konačni plazmid. Krajnji rezultat je rekombinantna dvolančana DNA molekula koja se dalje koristi kao kalup za PCR ili za transformaciju kompetentnih stanica *E. coli*. NEB Builder HiFi DNA Cloning kit sadrži linearizirani pUC19 vektor koji je dug 2686 pb te sadrži 54 pb dug MCS s različitim restriksijskim mjestima za 13 različitih endonukleaza i gen za rezistenciju na ampicilin. Slijed radnji pri upotrebi ovog kita prikazan je shematski i opisan na slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz mehanizma reakcije kloniranja s kitom NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix. U prvom koraku kloniranja DNA se priprema pomoću PCR-a ili digestijom restrikcijskim enzimom. U drugom koraku se koristi kit za kloniranje gdje u jednoj „Eppendorf-ici“ egzonukleaza degradira 5' krajeve kako bi ostali 3' istureni krajevi, DNA polimeraza popunjava praznine dok DNA ligaza ligira lomove u rekombinantnom DNA-plazmidu. Nakon toga slijedi transformacija i selekcija transformanata. U zadnjem koraku transformanti se analiziraju digestijom restrikcijskim enzimima i elektroforezom, PCR-om ili sekvenciranjem. (<https://www.neb.com/products/e5520-nebuilder-hifi-dna-assembly-cloning-kit> , pristupljeno: 13.6.2017.)

S druge strane, Zero Blunt® Cloning Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) može klonirati samo inserte i vektore ravnih krajeva s više od 80 % efikasnosti transformacije. Kit koristi ExpressLink™ T4 DNA ligazu, a kao i kod prethodno opisanog NEB kita reakcija se provodi unutar 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Osim toga, Invitrogen-ov kit koristi vektor pCR-Blunt koji je dug oko 3,5 kb i sadrži 16 restrikcijskih mjesta. Vektor sadrži i ccdB gen čijom ekspresijom nastaje protein smrtonosan za *E. coli* , a nalazi se na C-terminusu gena *lacza*. Ligacija DNA fragmenta s ravnim krajevima prekida ekspersiju lacZa-ccdB gena i stvaranje štetnog spoja u stanici što rezultira time da na hranjivoj podlozi imamo samo transformante. NEB Cloning kit ima vektor pUC19 sadrži gen *bla* koji mu omogućava rezistenciju na ampicilin, dok Invitrogen-ov vektor pCR-Blunt ima gene za rezistenciju na kanamicin i zeomicin što proširuje odabir antibiotika u hranjivim podlogama. Iako Invitrogen kit nema širok spektar kod kombiniranja različitih duljina i krajeva inserata kao NEB, ipak dodatnu sigurnost (osim rezistencije na antibiotik) pri transformaciji daje opcija sinteze spoja koji je smrtonosan za ne transformiranu stanicu.

U ovom radu korišten je TA Cloning kit s pGem-T Easy vektorom (Invitrogen). Temeljni princip kloniranja je taj što pGEM-T Easy kao linearizirani plazmid sadrži timine na 3' terminusu obaju lanaca. Budući da fragmenti dobiveni PCR metodom uz korištenje Taq polimeraze na svojim 3' krajevima sadrže adenine, omogućena je uspješna ligacija kohezivnih krajeva sa vektorom (Slika 8).



Slika 8. Prikaz komplementarnog sparivanja između pGem-T Easy plazmida i DNA fragmenta umnoženog PCR-om pomoću Taq polimeraze. Taq polimeraza ostavlja adenine na 3' krajevima DNA fragmenata, a pGem-T Easy vektor sadrži ugrađene timine na 3' krajevima te je na taj način osigurano komplementarno sparivanje između inserta i vektora kod TA ligacije. (<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSsdwwWfvOJVwphvtYL63ProZ9UeggeG1bhSYq-Nj7ZNQZHrm-OFQ>, pristupljeno: 23.6.2017.)

Ligaza koja se koristi je ExpressLink™ T4 DNA ligaza. Kao u prethodna dva kita reakcijsko vrijeme je 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Transformanti se na LB tekućoj podlozi selektiraju pomoću ampicilina jer vektor sadrži gen *bla* za rezistenciju na ampicilin. U odnosu na dva prethodno opisana kita, TA Cloning kit je više specifičan jer ligira samo jedan tip krajeva, što mu je zapravo nedostatak. S druge strane ukoliko se za umnažanje fragmenata PCR-om koristi Taq polimeraza koja uvijek ostavlja adenine na 3' krajevima, odabirom vektora kao što je pGem-T Easy koji sadrži ugrađene timine na 3' krajevima nije potrebno restriktivnim enzimima cijepati insert i vektor nego se odmah pristupa njihovom ligiranju.

2.7. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je eukariotski mikroorganizam iz kraljevstva Fungi kojeg je prvi put izolirao Emil Mrak 1983. godine (Mortimer i Johnston, 1986). Najpoznatiji je po svojoj važnosti u prehrambenoj industriji kao osnovna komponenta za proces fermentacije (konverzije šećera u alkohol), a u te svrhe se koristi nekoliko tisuća godina. Osim toga, koristi

se i kao modelni organizam za proučavanje biokemijskih procesa u stanicama te je od izrazite važnosti za istraživanje ljudskog genoma jer većina gena *S. cerevisiae* pokazuje homologiju sa humanim genima. Još jedna prednost je što ima kratko generacijsko vrijeme (90 minuta) te mogućnost izmjena haploidne i diploidne generacije.

Stanična stijenka kvasca osigurava stanici mehaničku čvrstoću, osmotsku stabilnost i omogućava komunikaciju s okolinom. To je dvosloj čiji je jedan sloj građen od hitina i glukana (odgovorni za mehaničku čvrstoću), a manoproteini čine drugi sloj (Smith i sur., 2000). Stijenka čini oko 20 % suhe tvari stanice, a u svom sastavu sadrži do 90 % ugljikohidrata i oko 10% proteina. Što se tiče manoproteina, trenutno ih je poznato oko 30, ali njihove uloge u stanici su uglavnom nepoznate (Fleet, 1991). Uklanjanjem nekih od manoproteina iz stijenke nisu se dokazale nikakve značajne promjene za normalno funkcioniranje stanice.

Manoproteini se vežu na dva načina u staničnu stijenk. Tako prvu skupinu čine proteini koji se kovalentno vežu na glukanski sloj stanične stijenke, a oni se još dijele na tzv. GPI i PIR proteine. GPI proteini vezani su preko glikozilfosfatidilinozitolnog ostatka (GPI sidra) na β -1,6-glukan, a iz stijenke se ekstrahiraju tretmanom sa glukanaazama. Pir-proteini su za glukan vezani esterskom vezom između gama-karboksilne grupe specifičnog ostatka glutaminske kiseline proteina, koja se nalazi unutar ponavljajuće sekvence koja je specifična za ovaj tip proteina, te hidroksilne grupe glukoze iz β -1,3-glukana stijenke. Ovi proteini se ekstrahiraju pomoću 30 mM NaOH (Mrša i sur., 1997) jer je veza alkalno labilna. Nekovalentno vezani proteini čine drugu skupinu manoproteina, a oni se izoliraju iz stanične stijenke vrućim SDS-om uz dodatak β -merkaptoetanol.

2.7.1. Scw4 protein

Ovaj protein se prvo svrstavao u nekovalentno vezane proteine stanične stijenke i iako je jedan od najzastupljenijih iz te skupine, njegova uloga je i dalje nepoznata. Daljnjim istraživanjem je otkriveno da se Scw4 protein veže i kovalentno u staničnu stijenk jer je izoliran iz stijenke pomoću NaOH kao i kovalentno vezani PIR proteini (Teparić i sur., 2007). Nije sigurno zbog čega se Scw4 veže na dva načina u stijenk, ali je zanimljivo to da Scw4 nema specifičnu sekvencu kao PIR proteini koji se vežu sličnim kovalentnim vezama u staničnu stijenk pa je moguće da postoji i treći način kovalentnog vezivanja.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i uređaji

- agaroz - Sigma-Aldrich Life Science, (St. Louis, Missouri, SAD)
- kvaščev ekstrakt, baktotripton – Biolife (Milano, Italija)
- λ DNA standard za elektroforezu (pocijepana sa HindIII), (New England Biolabs)
- restrikcijski enzimi: SacI i XbaI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)
- Taq polimeraza (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)
- T4 DNA ligaza (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)
- ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka),
- TAE pufer (40 mmol/L TRIS-HAc pH 8,0; 1 mmol/L EDTA)
- kit za pročišćavanje fragmenata umnoženih PCR-om QIAquick PCR purification Kit („Qiagen“, Valenca, California, SAD)
- kit za izolaciju plazmida iz stanica *E.coli* Monarch® Plasmid Miniprep Kit (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)
- kit za izolaciju DNA iz gela NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)

Ostale kemikalije su analitičke čistoće također i nabavljene od uobičajenih dobavljača.

Uređaji :

- transiluminator (Hoefer, Macrovue UVis-20)
- uređaj za PCR (Labnet)
- kadica za elektroforezu DNA (Biorad)
- izvor napajanja za kadicu za elektroforezu (SX250 MightySlim, Hoefer)
- termoblok (Bio TDB-100, BioSan)
- centrifuga (Centric 150, Tehnica)
- termostatirana tresilica za uzgoj bakterijskih kultura (KS 4000, IKA)
- električna grijalica (Techno, Kartell)

3.1.2. Nukleotidi

Oligonukleotidne početnice koje su korištene za deleciju dijela sekvence *SCW4* gena PCR metodom prikazane su u tablici 1.

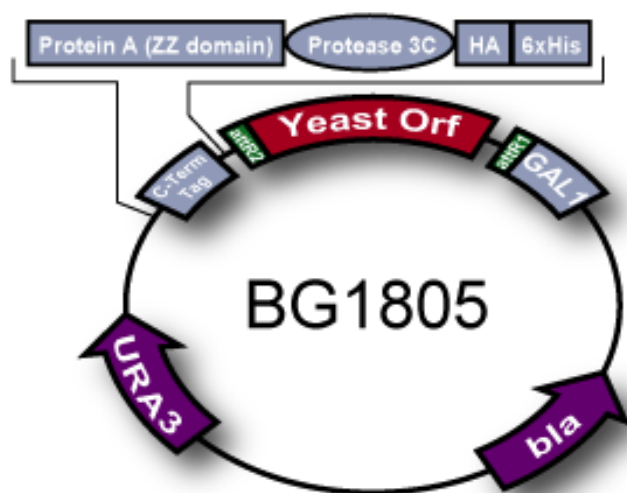
Tablica 1. Sekvence oligonukleotidnih početnica korištenih za provedbu delecije dijela sekvence i umnažanje mutiranog gena metodom PCR-a.

Početnica	Sekvenca
Δ 246 SCW4 F	CTGCTGCTACTCTTGCTGCTGGTAGATCTGCCTTGAAGGC
Δ 246 SCW4 R	GCCTTCAAGGCAGATCTACCAGCAGCAAGAGTAGCAGCAG
Xba SCW4 R	ATGATGATGTCTAGATTCATTGGATAG
Galprom F	GCTGGAGCTCCACCGCGGGAACGGATTAGAAGCC

3.1.3. Plazmidi

pBG1805

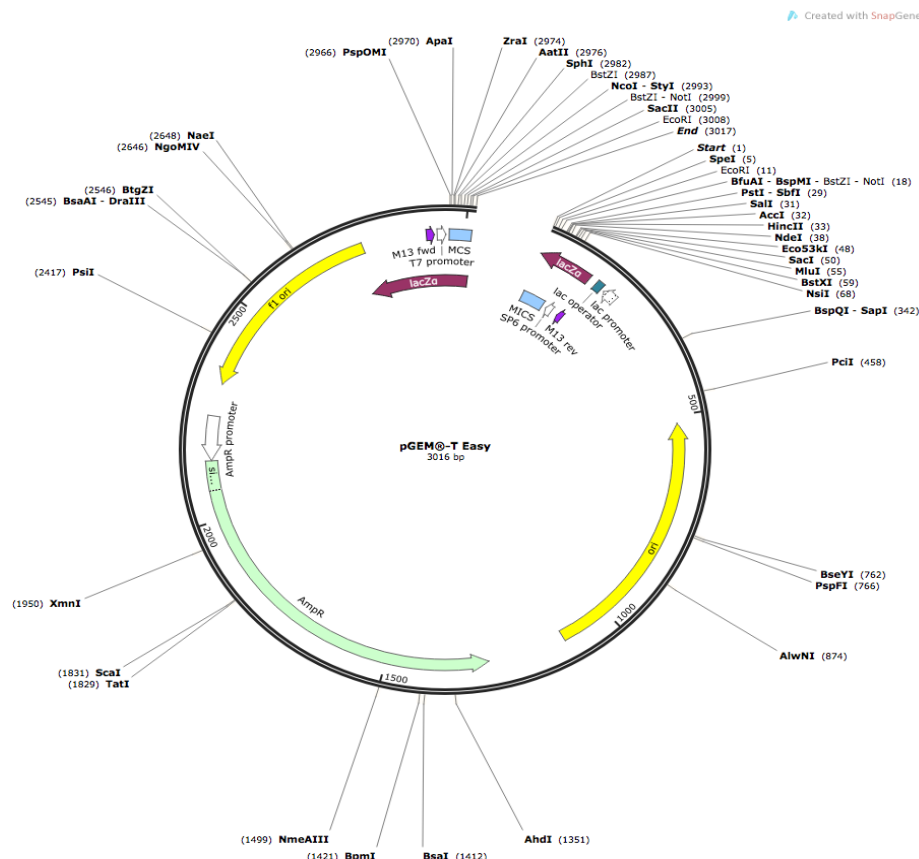
U eksperimentalnom dijelu je za konstruiranje fragmenta Δ 246 iz gena *SCW4* PCR metodom kao kalup korišten plazmid pBG1805 (Slika 9). Ovaj plazmid sadrži *ori* ishodište replikacije što mu omogućava samostalno umnažanje u bakteriji *E.coli*. *SCW4* gen se nalazi pod kontrolom promotora *GAL*. Također, sadrži i gen *BLA* koji kodira za enzim β -laktamazu koji omogućava bakterijama preživljavanje na podlozi s ampicilnom pa se na taj način selektiraju bakterijske stanice.



Slika 9. Shematski prikaz građe pBG1805 plazmida. Na shemi su prikazani ishodište replikacije u kvascu (Yeast Orf), promotor GAL1, gen *bla* za rezistenciju na ampicilin, gen za sintezu uracila (*URA3*) kao selektivni marker, tag His6-HA-3C-ZZ (Protein A, Protease 3C, HA i 6xHis), te rekombinacijska mjesta (attR1 i attR2). (<http://dharmacon.gelifesciences.com/cdnas-and-orfs/non-mammalian-cdnas-and-orfs/yeast/yeast-orf-collection/>, pristupljeno: 15.4.2017.)

pGEM-T Easy

Ovaj plazmid korišten je za TA ligaciju fragmenata DNA koji su dobiveni PCR metodom. pGEM-T Easy je linearizirani plazmid koji ima timidine na 3' terminusu obaju lanaca. Budući da fragmenti dobiveni PCR metodom uz korištenje Taq polimeraze na svojim krajevima sadrže adenine, omogućena je uspješna ligacija kohezivnih krajeva sa vektorom. Plazmid pGEM-T Easy sadrži još i gen za rezistenciju na ampicilin pa omogućava selekciju transformiranih bakterija *E. coli* na hranjivoj podlozi s tim antibiotikom (Slika 10).



Slika 10. Shematski prikaz građe pGEM-T Easy plazmida. Na shemi su prikazani položaji ishodišta replikacije (f1 ori; ori), gena za rezistenciju na ampicilin (AmpR) i LacZ, mjesta za ubacivanje inserta, postojećih restrikcijskih mjesta u plazmidu, mjesta za vezanje komercijalnih oligonukleotida za sekvenciranje (M13) i promotora lac, T7 i SP6. ([https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/ta_and_gc_cloning_vectors/pGEM-T_Easy_\(linearized\)/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/ta_and_gc_cloning_vectors/pGEM-T_Easy_(linearized)/), pristupljeno: 25.4.2017.)

3.1.4. Soj bakterije

E. coli koja je korištena za transformaciju ima genotip: DH5α F- Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk -, mk +) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1 (Life Technologies).

3.1.5. Hranjiva podloga za uzgoj bakterija

Prije transformacije *E. coli* je uzgajana na krutoj i tekućoj LB podlozi. Tekuća podloga sadržavala je kvašćev ekstrakt ($\varphi = 0,05$), baktotripton ($\varphi = 0,01$), NaCl ($\varphi = 0,05$), a kruta baktotripton ($\varphi = 0,01$), kvašćev ekstrakt ($\varphi = 0,05$), NaCl ($\varphi = 0,05$) i agar ($\varphi = 0,015$).

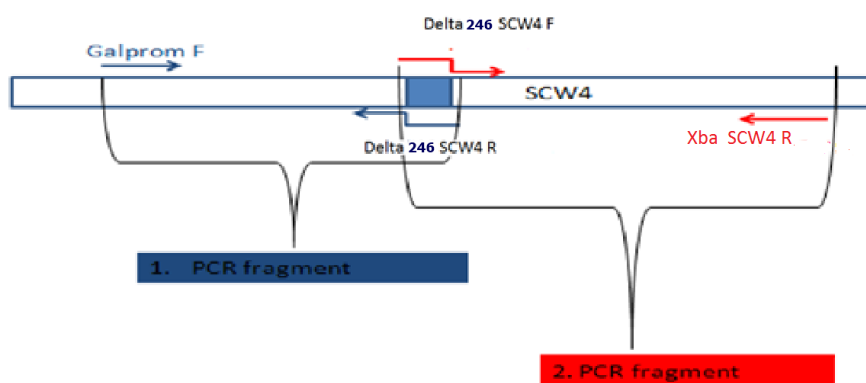
Nakon što su bakterijske stanice transformirane pomoću plazmida koji nosi i gen za rezistenciju na ampicilin, u hranjivu LB podlogu je dodan i ampicilin u koncentraciji 100 µg/mL.

3.2. Metode

3.2.1. Konstrukcija inserta $\Delta 246$ *SCW4*

Insert $\Delta 246$ *SCW4* konstruiran je pomoću PCR-a (lančana reakcija polimeraze) metodom "megapočetnice". Ta se metoda zasniva na činjenici da početnice koje se koriste nisu potpuno komplementarne kalupu DNA te se na taj način deletiraju sekvence u ciljanom genu. PCR je proveden u tri koraka.

U prvom koraku korišten je kao kalup plazmid pBG1805 *SCW4* te parovi početnica $\Delta 246$ Scw4 R i GalpromF te $\Delta 246$ SCW4 F i Xba SCW4 R. Dobivena su 2 PCR produkta. Prvi PCR produkt nazvan $\Delta 246_1$ (585 pb) dobiven je pomoću parova početnica $\Delta 246$ SCW4 R i GalpromF s kojima je umnožen dio promotorske regije i početak gena *Scw4*, a nije umnožen dio gena koji želimo izbaciti jer u toj sekvenci početnica nije komplementarna kalupu (plazmidu pBG1805 *SCW4*). Drugi PCR produkt nazvan $\Delta 246_2$ (458 pb) dobiven je s početnicama $\Delta 246$ SCW4 F i Xba SCW4 R s kojima je umnožen dio gena nizvodno od mjesta iz kojeg su deletirane nukleotidne sekvence iz gena *SCW4* (Slika 11).



Slika 11. Shematski prikaz 1. kruga PCR-a. Deletiranje dijela sekvence gena *SCW4* koji kodira za 246 aminokiselina na N-terminalnom kraju proteina Scw4. Na shemi je prikazano kako je za dobivanje 1. PCR fragmenta korištena početnica Galprom F i $\Delta 246$ SCW4 R, dok je za dobivanje 2. PCR fragmenta korištena početnica $\Delta 246$ SCW4 F i Xba SCW4 R. U dijelu označenim plavim pravokutnikom početnice $\Delta 246$ SCW4 R i $\Delta 246$ SCW4 F nisu komplementarne kalupu DNA pa se taj dio ne umnaža PCR-om, odnosno deletira se. U tablici 2 dani su volumeni reakcijskih komponenti korištene u prvom PCR-u.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za prvi krug PCR-a

Otopina	Volumen / μL
Voda	38,7
Plazmid pBG1805 <i>SCW4</i>	0,3
Pufer za Taq polimerazu (10x koncentriran)	5
Smjesa sva četiri dNTP-a	1
Odgovarajuće početnice (svaka zasebno)	2
Tag polimeraza	1

PCR je proveden kroz tri ciklusa sa različitim brojem ponavljanja.

Prvi ciklus sastojao se od denaturacije plazmidne DNA kroz 5 minuta pri temperaturi od 95°C.

Umnažanje produkata u drugom ciklusu je ponovljeno 30 puta pri čemu se denaturacija odvijala kroz 45 sekundi na 95 °C, sparivanje DNA kalupa i početnica je provedena na 68,5°C kroz 1,5 minutu te sinteza DNA na 72 °C kroz 36 sekundi.

Nakon toga je provedena završna elongacija na 72 °C kroz 7 minuta.

Dobivena su dva PCR produkta ($\Delta 246_1$ i $\Delta 246_2$) čija je duljina provjerena pomoću DNA elektroforeze te su nakon toga pročišćeni iz gela kitom za pročišćavanje fragmenata umnoženih PCR-om prema uputama proizvođača.

Kako su dva dobivena produkta međusobno komplementarna u sekvenci u kojoj početnice nisu bile komplementarne s kalupom, u sljedećem koraku je provedeno povezivanje dva PCR produkta u jedan konstrukt nazvan $\Delta 246$ *SCW4*. Za to je bilo potrebno odrediti koncentraciju pojedinog fragmenta nakon pročišćavanja kako bi se izračunalo koliki volumen uzorka uzimamo za sljedeći PCR tako da u smjesi za PCR imamo ekvimolarne količine fragmenata.

Koncentracija je određena tako da je mjerena apsorbancija (za $\Delta 246_1$ i $\Delta 246_2$) pri 260 nm. Za mjerenje apsorbancije je uzeto 4 μL svakog fragmenta te 396 μL deionizirane vode, tj. razrjeđenje je bilo 100x. Iz dobivene vrijednosti apsorbancije izračunata je koncentracija fragmenata prema formuli:

$$\gamma = A_{260} \cdot f \cdot 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$
 u kojoj je f faktor razrjeđenja, a 50 $\mu\text{g/mL}$ je koncentracija DNA pri kojoj je A_{260} jednak 1.

Uz pomoć dobivene vrijednosti masene koncentracije, volumen za oba fragmenta koji treba dodati za novi PCR izračunat je prema formuli:

$$V = L \cdot \frac{M}{Y}$$

L- duljina fragmenta (kb)

M-recipročna vrijednost sume duljina fragmenata (1/kb) koji se koriste u ovom koraku PCR-a.

U drugom koraku fragmenti dobiveni prvim PCR-om služe jedan drugom kao kalup i ujedno kao početnice, a povezuju se preko komplementarnih dijelova sekvence. U tablici 3 navedene su sve komponente s odgovarajućim volumenima koji su korišteni u drugom koraku PCR-a.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za drugi krug PCR-a.

Otopina	Volumen / μL
Voda	38,8
$\Delta 246_1$ (1.produkt)	1, 6
$\Delta 246_2$ (2.produkt)	2,6
Pufer za Taq polimerazu (10x koncentriran)	5
Smjesa sva 4 dNTP-a	1
Taq polimeraza	1

PCR je proveden tako da je denaturacija trajala 45 sekundi pri 95°C, povezivanje fragmenata je pri 60°C trajalo 1,5 minutu, a sinteza DNA je pri 72°C trajala 2 minute. Ciklus je ponovljen 15 puta.

Nakon 15 cikusa iz drugog PCR-a uzet je alikvot od 10 μL reakcijske smjese i dodan u novu PCR smjesu u koju su sada dodane "vanjske" početnice GalpromF i Xba SCW4 R. Uvjeti reakcije su ostali isti, ali je umjesto 15, napravljeno 30 ciklusa.

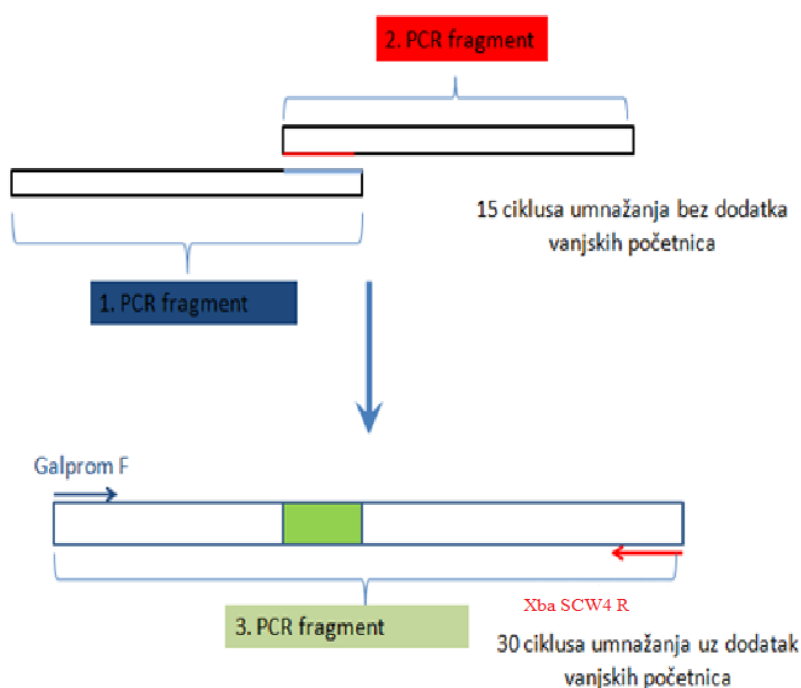
Nakon tih ciklusa opet je provedena završna elongacija na 72°C kroz 5 minuta. U tablici 4 prikazane su komponente reakcijske smjese u završnom koraku PCR-a.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za treći krug PCR-a.

Otopina	Volumen / μL
---------	-------------------------

Voda	31, 5
Reakcijska smjesa iz prethodnog PCR-a	10
Pufer za Taq polimerazu (10x koncentrirani)	5
Smjesa sva 4 dNTP-a	1
“Vanjske” početnice (Galprom F i Xba SCW4 R) (svaka zasebno)	1
Taq polimeraza	0, 5

Slika 12 prikazuje shematski drugi i treći korak PCR-a. Plavom i crvenom bojom označeni su dijelovi dobivenih fragmenata koji nisu komplementarni kalupu, ali jesu međusobno što omogućava njihovo spajanje u završni PCR produkt. Zelenom bojom označen je komplementarni dio dvaju fragmenata.



Slika 12. Shematski prikaz 2. i 3. koraka PCR-a (metoda “megapočetnice”). Na shemi je prikazan 2. korak PCR-a koji se sastojao od 15 ciklusa umnažanja bez dodatka vanjskih početnica, a korišten je pri sintezi 3. PCR fragmenta u kojem je deletiran dio gena koji kodira za 246 aminokiselina. U 3. koraku PCR-a korištenjem samo Galprom F i Xba SCW4 R umnožen je 3. fragment PCR-a

Dobiveni posljednji PCR produkt je ponovno podvrgnut provjeri na elektroforezi i nakon toga pročišćavanju.

3.2.2. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

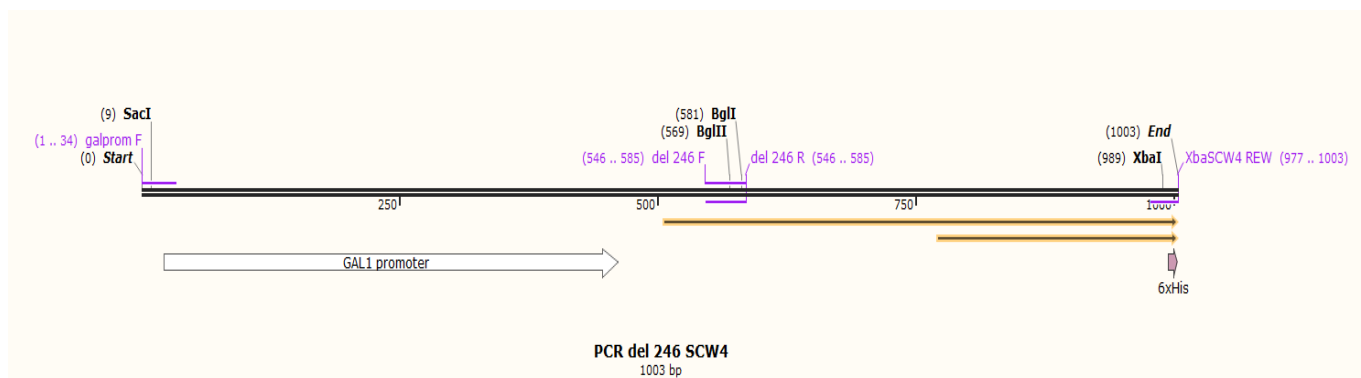
Elektroforeza je provođena za provjeru duljine produkta dobivenih PCR-om u agaroznom gelu (1%), koji je pripremljen otapanjem agaroze uz zagrijavanje u TAE puferu (242g Tris baze otopljene u vodi, 57,1mL glacijalne octene kiseline, 100mL 500mM EDTA pH 8 nadopunjeno do volumena od 1 L). Nakon polimerizacije gela i nanošenja uzoraka, elektroforeza je trajala oko 45 minuta pri naponu od 80 V. Nakon toga je gel uronjen u otopinu etidij-bromida (1mg/L) na 15 minuta i zatim su pod UV-svjetlom na transiluminatoru bile vidljive DNA vrpce. Vrpce PCR produkata uspoređivane su sa standardnom „1kb ladder DNA“.

3.2.3. Pročišćavanje fragmenata DNA umnoženih PCR-om

Nakon što je veličina umnoženih fragmenata provjerena na elektroforezi, slijedi pročišćavanje fragmenta pomoću kita za pročišćavanje, a postupak se vrši prema uputama proizvođača.

3.2.4. TA-ligacija fragmenta DNA

Provedena je ligacija PCR produkta s lineariziranim vektorom pGEm-T Easy. Na slici 13 je redom s lijeva na desno prikazano mjesto gdje se veže vanjska početnica Galprom F (od 1. do 34. para baza), položaj *GAL1* promotora u konstrukt, mjesta vezanja unutarnjih početnica Δ246 F i Δ246 R (od 546. do 585. para baza), položaj genetičke oznake His-tag (sastoji se od 6 histidina) te mjesto vezanja vanjske početnice Xba SCW4 R (od 977. do 1003. para baza) u fragmentu koji je ligiran u vektor.



Slika 13. Shema inserta Δ246 za TA ligaciju s vektorom. Δ246 *SCW4* sadrži mjesto za vezanje početnice Galprom F, Δ246 *SCW4* R, Δ246 *SCW4* F i Xba *SCW4* R, promotor GAL1, mjesta prepoznavanja restrikcijskih enzima te His tag.

Prije toga je određena koncentracija fragmenta mjerenjem apsorbancije pri 260 nm kako bi u ligacijskoj smjesi mogli podesiti omjer koncentracije fragmenta i vektora u odnos 3:1.

Volumen potrebnog inserta se računa preko formule:

$$m(PCR\ insert) = \frac{m(vektor, ng) \cdot duljina(PCR\ insert, kb)}{duljina(vektor, kb)} \times \frac{insert}{vektor}$$

Ligacija je napravljena prema uputama proizvođača kita za TA ligaciju što znači da je smjesa ostavljena 15 minuta na sobnoj temperaturi te potom na ledu 2 minute, nakon čega je slijedila transformacija kompetentnih stanica *E. coli*. U tablici 5 prikazan je sastav ligacijske smjese.

Tablica 5. Sastav ligacijske smjese

Otopina	Volumen (μL)
Pufer za ligazu	5
Vektor pGem-T Easy	1 (50ng)
Insert Δ246	0,42
Deionizirana voda	13,58
T4 DNA ligaza	1

3.2.5. Transformacija kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli*

U 50 µL suspenzije kompetentnih stanica dodano je 10 µL ligacijske smjese i stanice su inkubirane na ledu 30 minuta. Nakon toga je proveden "heat shock" od 20 sekundi na 42 °C, te je zatim suspenzija stanica vraćena u led na 2 minute. Potom je suspenziji stanica dodano 950 µL prethodno termostatiranog (37 °C) LB-a te je inkubirana kroz 1 sat na 37 °C bez miješanja. Dvije LB ploče sa dodatkom ampicilina su termostatirane na 37 °C. 200 µL suspenzije je naciepljeno na jednu krutu LB podlogu s ampicilinom, dok je na drugu naciepljen ostatak suspenzije stanica. Obje ploče su preko noći inkubirane na 37°C.

3.2.6. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije *Escherichia coli* („mini-prep“)

Izolacija plazmida provedena je iz 3 mL kulture stanica *E. coli* naciepljenih u tekuću LB podlogu s ampicilinom nakon inkubacije preko noći na 37 °C. Izolirani su pomoću Monarch Plasmid MiniPrep kita prema uputama proizvođača. Za provjeru uspješnosti izolacije plazmidne DNA koristi se prethodno opisana elektroforeza u 1%-tnom agaroznom gelu.

3.2.7. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Cijepanje izoliranih plazmidnih DNA restrikcijskim enzimima SacI i XbaI provedeno je prema uputama proizvođača restrikcijskih enzima.

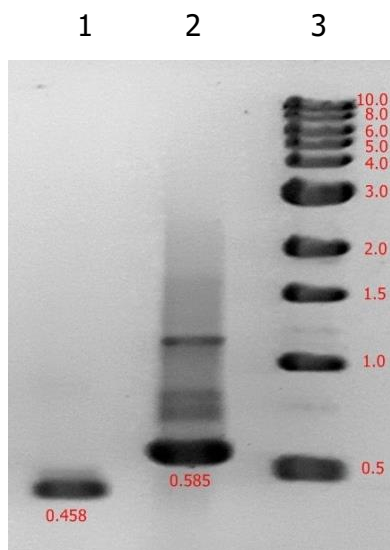
U početnu smjesu dodano je 5,5 µL vode, 3 µL plazmida koji je izoliran iz *E. coli*, 1 µL pufera za SacI i 0.5 µL SacI enzima te je smjesa inkubirana na 37°C tijekom 30 minuta. Nakon toga je u istu reakcijsku smjesu dodano 3 µL vode, 1,5 µL pufera za XbaI i 0,5 µL XbaI enzima. Smjesa je zatim inkubirana na 37 °C kroz 60 minuta.

4. Rezultati

4.1. Konstrukcija fragmenta $\Delta 246$ gena *SCW4*

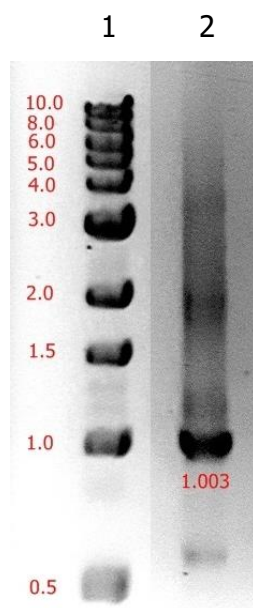
PCR-om je pomoću početnica $\Delta 246R$ i GalpromF konstruiran prvi PCR produkt $\Delta 246_1$ koji obuhvaća dio gena uzvodno od sekvence koju se želi deletirati iz gena (prema prethodno navedenim uvjetima u Metodama). Drugi PCR produkt $\Delta 246_2$, koji sadrži dijelove gena nizvodno od sekvence koju se želi deletirati iz gena, je konstruiran pri istim uvjetima pomoću početnica $\Delta 246F$ i XbaScw4.

Duljina fragmenata dobivenih PCR-om je zatim provjerena elektroforezom nakon čega su fragmenti pročišćeni pomoću kita za pročišćavanje PCR produkta prema uputama proizvođača. Na slici 14 se vidi kako je prvi fragment dug oko 458 pb, a drugi oko 585 pb, na osnovu čega se zaključuje da je uspješno proveden PCR u prvom koraku jer su to očekivane duljine fragmenata.



Slika 14. Elektroforeza fragmenata dobivenih u 1. krugu PCR-a. Elektroforeza je provedena u 1%-tnom agaroznom gelu nakon čega su fragmenti vizualizirani bojanjem pomoću etidij-bromida. Uzorci: 1. fragment $\Delta 246_2$; 2. fragment $\Delta 246_1$; 3. standard 1kb ladder.

Nakon toga proveden je drugi korak PCR-a prethodno opisan u poglavlju Materijali i Metode. Rezultati PCR-a provjereni su elektroforetskom metodom na 1% agaroznom gelu i vizualizirani pomoću etidij-bromida kao što je već spomenuto. Na slici 15 se vidi kako postoji jedna jaka vrpca približne duljine 1003 pb u duljini koja odgovara duljini fragmenta $\Delta 246$ gena *SCW4*.



Slika 15. Elektroforetska analiza smjese nakon 2. kruga PCR-a. Uzorci: 1. standard 1kb ladder, 2. fragment $\Delta 246$ *SCW4*.

4.2. Kloniranje gena *SCW4*

Nakon pročišćavanja, fragment $\Delta 246$ gena *SCW4* je TA-ligacijom ligiran u plazmid pGEM-T Easy.

Masa inserta za TA-ligaciju izračunata je preko formule:

$$m(\text{insert}) = \frac{m(\text{vektor}, \text{ng}) \cdot \text{duljina}(\text{PCR insert}, \text{kb})}{\text{duljina}(\text{vektor}, \text{kb})} \times \frac{\text{insert}}{\text{vektor}}$$

$$m(\text{insert}) = \frac{25 \text{ ng} \cdot 1003 \text{ kb}}{2588 \text{ kb}} \times \frac{3}{1} = 29,0668 \text{ ng}$$

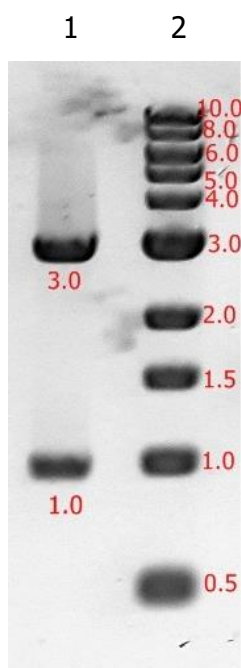
Uz koncentraciju inserta (70 ng/ μ L) koja je određena mjerenjem apsorbancije pri 260 nm na spektrofotometru izračunat je konačni volumen inserta u ligacijskoj smjesi:

$$V(\text{insert}) = \frac{m(\text{PCR fragment})}{\gamma(\text{PCR fragment})} = \frac{29,0668 \text{ ng}}{70 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 0,415 \mu\text{L}$$

Dobivenim plazmidom su transformirane kompetentne stanice *E.coli* kao što je opisano u poglavlju Metode. Iz odabranih kolonija poraslih na selektivnoj podlozi s ampicilinom izoliran je plazmid i uspješnost izolacije plazmida provjerena je pomoću elektroforeze .

Nakon toga, pristupljeno je cijepanju plazmida restrikcijskim enzimima SacI i XbaI kako je opisano ranije u Metodama. Potom je analizirana restrikcijska smjesa elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu.

Dobivene su dvije vrpce na gelu (Slika 16) od kojih donja predstavlja fragment $\Delta 246$ *SCW4*, a gornja vektor pGEM-T Easy. Ova analiza je pokazala da se plazmida sastoji od vektora pGEM-T Easy (~3kb) i inserta $\Delta 246$ *SCW4* (~1kb) te je plazmid ocijenjen kao uspješno ligirana DNA molekula.



Slika 16. Elektroforetska analiza restrikcijske smjese. Uzorci: 1. plazmid pocijepan restrikcijskim enzimima Xba I i Sac I; 2. standard 1kb ladder

5. Rasprava

Kloniranje gena je tehnika koja omogućuje umnažanje i prenošenje gena iz jedne stanice u drugu, a bazira se na činjenici da se fragment određene DNA može ligirati s drugim fragmentom DNA, odnosno vektorom. Taj vektor u svom sastavu sadrži ishodište replikacije, selektivni marker i druge gene koji mu omogućavaju replikaciju u stanici domaćinu i selekciju transformanata. Posebni se vektori koriste za kloniranje gena u *E. coli* kao modalni mikroorganizam, a posebni za stanice eukariota. Stanice domaćini koje primaju stranu DNA nisu uvijek kompetentne za primanje strane DNA i posebnim metodama se one učine kompetentnima primjerice elektroporacijom ili toplinskim šokom. Glavne tehnike kloniranja mogu se podijeliti na kloniranje fragmenata s ravnim i kohezivnim krajevima. Kod kloniranja s kohezivnim krajevima restrikcijske endonukleaze prepoznaju i cijepaju dvolančanu DNA unutar specifičnih nukleotidnih sekvenci odnosno restrikcijskih mjesta. Neki restrikcijski enzimi ostavljaju kratke isturene ili uvučene krajeve na 5' ili na 3' kraju. Kod ove vrste kloniranja se ponovno uspostavi restrikcijsko mjesto u ligiranoj molekuli. Kod kloniranja s ravnim krajevima dolazi do ligacije dvolančane DNA u linearizirani vektor koji nema nesparene krajeve lanaca koji bi se mogli preklopiti. Ovoj metodi dovoljno je da postoji dostupan 5' i 3' kraj lanca inserta i vektora kako bi u prisustvu T4 ligaze došlo do povezivanja lanaca DNA. Na ovaj način ne moraju se uvijek obnoviti restrikcijska mjesta nakon ligacije, ako oba fragmenta DNA nisu prethodno pocijepana istim enzimom. Krajevi DNA fragmenta kojeg želimo umnožiti i plazmidnog vektora u koji se unosi fragment moraju biti pocijepani istim enzimom/ima koji ostavlja/ju isti tip krajeva ili obrađeni enzimima egzonukleazama i polimerazama kako bi se mogli ligirati. Egzonukleaze su enzimi koji cijepaju isturene krajeve i pretvaraju ih u ravne. Druga mogućnost je da se djelovanjem polimeraza dodaju nukleotidi na uvučene krajeve pretvarajući ih u ravne. U praksi to znači da ako krajevi vektora sadrže ravne krajeve potrebno je i krajeve inserta pretvoriti u ravne (ako već nisu) kako bi ligacija bila uspješna. Ako insert (ili vektor) sadrži isturene krajeve onda i vektor (ili insert) mora imati krajeve koji su komplementarni kako bi se ligirali. Komercijalno su dostupni kitovi pomoću kojih se provodi ligaciju s kohezivnim kao i s ravnim krajevima istom efikasnošću. Takav kit je npr. NEB Builder Cloning kit koji u istoj reakcijskoj smjesi sadrži egzonukleazu koja cijepa krajeve DNA fragmenata inserta i vektora ostavljajući 3' isturene krajeve koje potom T4 DNA polimeraza popunjava, nakon čega ih DNA ligaza povezuje u konačni rekombinantni plazmid. Prednost tog kita je što omogućuje kloniranje više od 4 inserta različitih duljina i krajeva istovremeno u jedan vektor. Selekcija transformanata se odvija na temelju gena za rezistenciju na ampicilin ugrađenog u plazmidni vektor pUC19. Međutim, komercijalno su dostupni i kitovi pomoću kojih

se mogu klonirati samo ravni ili samo ljepljivi krajevi. Primjerice Zero Blunt tvrtke Invitrogen koji sadrži Link Express T4 DNA ligazu bez dodatnih egzonukleaza koje bi obradile krajeve. Ovim kitom se ligiraju ravni krajevi inserta i vektora pCR-Blunt u konačni plazmid. Prednost ovog kloniranja je ugrađeni gen *ccdB* u vektor čija ekspresija je smrtonosna za netransformiranu stanicu. Selekcija transformanata na LB podlozi s ampicilinom se izvodi tako što vektor sadrži gen za rezistenciju na ampicilin. Primjer komercijalno dostupnog kita za kloniranje samo ljepljivih krajeva je TA Cloning kit s pGem-T Easy vektorom. Selekcija transformanata se također izvodi na LB podlogama s ampicilinom. TA ligacija se događa između adenina koje Taq polimeraza ostavlja na 3' krajevima inserta tijekom njegove sinteze i timina na 3' krajevima koje sadrži vektor. Adenini i timini tvore preklapajuću regiju pri ligaciji kohezivnim krajevima.

U ovom radu deletiranjem dijela gena *SCW4* koji kodira za 246 aminokiselina na N-terminalnom kraju molekule proteina Scw4 iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* sintetiziran je konstrukt $\Delta 246$ *SCW4*, koji je zatim ligiran u plazmidni vektor pGem-T Easy. Delecija je izvedena pomoću tri kruga PCR-a metodom nazvanom metoda „megapočetnica“. Nakon prvog kruga dobivena su 2 PCR produkta. Prvi PCR produkt nazvan $\Delta 246_1$ (585 pb) dobiven je pomoću unutarnje početnice $\Delta 246$ SCW4 R i vanjske početnice GalpromF s kojima je umnožen dio promotorske regije i početak gena *SCW4*, a nije umnožen dio gena koji želimo izbaciti jer u toj sekvenci početnica nije komplementarna kalupu (genu *SCW4* u plazmidu pBG1805 *SCW4*). Drugi PCR produkt nazvan $\Delta 246_2$ (458 pb) dobiven je s unutarnjom početnicom $\Delta 246$ SCW4 F i vanjskom početnicom Xba SCW4 R s kojima je umnožen dio gena nizvodno od deletirane nukleotidne sekvence iz gena *SCW4*. Kako su dva dobivena produkta međusobno komplementarna u dijelu sekvenci u kojima unutarnje početnice nisu bile komplementarne s kalupom, u sljedećem koraku je provedeno povezivanje dva PCR produkta u jedan konstrukt nazvan $\Delta 246$ *SCW4*. U zadnjem koraku je pomoću dvaju vanjskih početnica umnožen na ovaj način dobiveni konačni konstrukt $\Delta 246$ *SCW4* koji je zatim ligiran TA-ligacijom u plazmidni vektor pGem-T Easy. DNA fragment $\Delta 246$ *SCW4* na svojim krajevima sadrži adenine jer je sintetiziran pomoću Taq polimeraze, dok vektor ima timine na svojim 3' – terminalnim krajevima, čime je omogućeno komplementarno sparivanje krajeva inserta i vektora. Konačnim ligiranim plazmidom su transformirane kompetentne stanice bakterije *E. coli* i uzgojene u LB tekućoj podlozi s ampicilinom. Vektor sadrži gen *bla* koji transformiranim stanicama omogućuje rezistenciju na ampicilin, zbog čega su na podlozi porasli samo transformanti. Izolirani plazmidi su zatim podvrgnuti restrikciji. Restrikcijska smjesa je analizirana u 1%-tnom agaroznom gelu elektroforezom te je utvrđeno da su insert i vektor odgovarajuće veličine tj. da je ligacija željenog DNA fragmenta u vektor bila uspješna.

6. Zaključci

Željeni konstrukt $\Delta 246$ *SCW4* uspješno je dobiven PCR-metodom.

Konstrukt $\Delta 246$ *SCW4* je uspješno ligiran TA ligacijom u plazmidni vektor pGem-T Easy.

Plazmid sa konstruktom $\Delta 246$ *SCW4* je uspješno kloniran u stanicama *E. coli*.

7. Literatura

Anonymous - Cloning strategies (2017). European Molecular Biology Laboratory. <https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/pcr_strategy/optimising_pcr/> Pristupljeno 23. ožujka 2017.

Fairbanks, D. S. (2004) Cloning: Chronology, Abstracts and Guide to Books, 1. izd., Nova Science Publishers. str. 186-189.

Fleet, G. H. (1991) Cell wall. *The Yeasts* **18**: 199-277.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **4**: 557-580.

Lodish H., Berk A., Zipursky S. L. (2000) Molecular cell Biology, 4.izd., W.H.Freeman and Company. str. 192-196.

Lodish H., Berk A., Zipursky S. L. (2013) Molecular cell Biology. 7. izd., W.H.Freeman and Company. str. 192-216.

Lukjancenko, O., Wassenaar, T. M., & Ussery, D. W. (2010) Comparison of 61 Sequenced *Escherichia coli* Genomes. *Microbial Ecology* **60**: 708-720.

Michelsen, B. K. (1995) Transformation of *Escherichia coli* Increases 260-Fold upon Inactivation of T4 DNA Ligase. *Analytical Biochemistry* **225**: 172-174.

Mortimer R. K., Johnston J. R. (1986) Genealogy of Principal Strains of the Yeast Genetic Stock Center. *Genetics* **113**: 35-43.

Mrša V., Seidl T., Gentzsch M., Tanner W. (1997) Specific labeling of cell wall proteins by biotinylation: Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 1145-1154.

Sambrook J., Green M. R. (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4. Izd., Cold Spring Harbor. str. 133-205.

Smith A. E., Zhang Z., Thomas C. R., Moxham K. E., Middelberg A. P. (2000) The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **97**: 9871-9874.

Surzicky S. (2000) Basic Techniques in Molecular Biology, 1.izd., Springer-Verlag Berlin Heidelberg. str. 101-118.

Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2007) Binding assay for incorporation of alkali extractable proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **24**: 259-266.

Zhang Y., Muirers Joep P. P., Testa G. (2000) DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **18**: 1314 - 1317.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.
